

노닐페놀을 주사한 조피볼락의 신장 MFO (mixed function oxidase)의 반응

전종균* · 이지선 · 손영창 · 홍경표¹ · 심원준² · 김병기³ · 한창희⁴
강릉대학교 해양생명공학부/동해안해양생물자원연구센터, ¹한국해양연구원 해양생물자원연구본부
²한국해양연구원 남해연구소, ³강원도립대학 해양생물자원개발과, ⁴동의대학교 생명과학부

Responses of Renal Mixed Function Oxidase System in Rockfish (*Sebastes schlegeli*) Administered with 4-Nonylphenol

Joong-Kyun JEON*, Ji-Seon LEE, Young-Chang SOHN, Gyong-Pyo HONG¹,
Won Joon SHIM², Pyong-Kih KIM³ and Chang-Hee HAN⁴
Kangnung National University/EMBRC, Gangneung 210-702, Korea
¹Marine Living Resources Research Division, KORDI, Ansan 425-170, Korea
²South Sea Institute, KORDI, Geoje 656-830, Korea
³Gangwon Provincial University, Gangneung 210-804, Korea
⁴Division of Life Science, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

Effects of 4-nonylphenol (4-NP) on mixed function oxygenase (MFO) in the kidneys of rockfish (*Sebastes schlegeli*) were investigated. The cytochrome P450 (CYP) contents and NADPH cytochrome P450 reductase, NADH cytochrome b5 reductase and 7-ethoxyredorufin-O-deethylase (EROD) activities of microsome, glutathione S-transferase (GST) activity of cytosol in rockfish exposed to 4-NP for 7 days using an intraperitoneal injection (25 mg/kg) were quantitatively determined. The GST activity of rockfish exposed to 4-NP were higher, up to 5.2 times higher, than those in the control fish. The activities of NADPH- and NADH-dependent reductases were inhibited. On the other hand, CYP contents and EROD activity of the 4-NP exposed fish demonstrated neither an increasing or decreasing trend.

Key word: 4-Nonylphenol, *Sebastes schlegeli*, Kidney, Cytochrome P450, EROD, Glutathione S-transferase

서론

산업의 발달과 더불어 수많은 화합물이 만들어져 소비되고 폐기되었는데 해양은 이들 화합물들이 최종적으로 도달하는 곳이어서 이곳에 서식하는 많은 생물들은 직·간접적으로 영향을 받는다 (Tsuda et al., 2002). 이런 화합물 가운데 1940년대에 개발된 알킬페놀 폴리에톡실레이트 (alkylphenol polyethoxylate)는 비이온성 표면활성제 (non-ionic surfactant)로는 가장 일반적으로 쓰이는 물질이며 세제나 도료 성분, 제조제, 농약 등에 널리 쓰인다. 이들의 주 사용지는 대개 육상이고 사용 후에는 폐수처리장을 통해 수계로 유입된다. 그리고 처리장에서는 소수성 화합물인 노닐페놀 (nonylphenol, NP)과 옥틸페놀 (octylphenol)로 분해되어 슬러지나 강바닥에 축적됨으로서 해산이나 담수산 생물에게 독성을 나타낸다 (McLeese et al., 1981; Tsuda et al., 2002). 특히, NP는 내분비계 교란작용이 있다는 것이 *in vitro*나 *in vivo* 연구에서 밝혀진 바 있다 (Yadete and Male, 2002).

NP는 그 기원이 주로 육상이고 분해속도는 빠른 편이어서 해양에서는 매우 낮은 농도로 존재하지만, 해양생물의 생식생리에 미치는 영향은 낮은 농도에서도 크다는 것이 알려져 있다 (Kime, 1998).

오염물질이 간장에 미치는 영향을 조사한 연구에 비하면 신장의 기능이나 이 기관에 미치는 영향에 대해서는 잘 알려져 있지 않은 편이다. 하지만 신장도 중요한 내분비계 중 하나이며 스트레스 반응에 관여하고 스테로이드 호르몬이나 아드레날린을 생산하는 장소이다 (Chester Jones and Mosley, 1980). 어류도 스트레스를 받으면 corticosteroid가 만들어지는데, cytochrome P450 (CYP)와 mixed function oxidase (MFO)가 그 생성에 관여를 하므로 MFO 활성화에 영향을 미치는 오염물질은 스테로이드 호르몬의 합성에 영향을 미칠 수가 있다 (Henderson and Kime, 1987).

전보 (Jeon et al., 2003)에서는 4-NP를 조피볼락 (*Sebastes schlegeli*)에게 주사하고 간장 중 약물대사효소계의 반응을 보고한 바 있어 이번에는 4-NP를 같은 어류에게 주사하여 신장에 분포하는 약물대사 효소의 반응을 조사하여 조직간에 약물대사효소계의 반응이 차이를 보이는지 등을 살펴보고 있다. 이하 그 결과를 정리한다.

재료 및 방법

실험 어류

강원도 삼척의 개인양식장에서 부화시켜 사육 중인 비슷한 크기의 조피볼락 (평균 체중 247 g)을 강원도립대학 양식장의

*Corresponding author: jkjeon@kangnung.ac.kr

원형수조 (500 L 용량)로 옮겨 약 2주간 안정화시킨 다음 실험에 사용하였다. 사육조건은 자연광 하에서 여과해수를 지속적으로 공급하였으며, 실험 기간 중 수온은 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 였고, aeration으로 공기를 충분히 공급하였다.

실험방법

4-NP (Aldrich Chem., U.S.A)를 DMSO (dimethylsulfoxide; Sigma Chem., U.S.A.)에 녹여 조피볼락 체중 (kg) 당 25 mg을 암수 구별 없이 60마리에게 복강주사를 하였고, 대조를 위한 sham구에는 DMSO만을 주사하였다. 주사량은 체중 당 (kg) 1 mL가 되도록 어류를 칭량 후 주사하였다. 그리고 조피볼락은 주사 후 12, 24, 48, 72 및 168시간째에 매 실험구에서 9마리씩 꺼내어 분석에 사용하였다. 우선 어류를 얼음 위에 위치시키고 미부정맥에서 헤파린 처리한 주사기로 채혈한 다음 즉시 개봉을 하여 신장을 적출하였으며, 액체질소에 침지시켜 동결하여 드라이 아이스를 채운 아이스박스에 담아 실험실로 운반하였다. 그리고 이것을 실험에 사용하기까지 -80°C 의 초저온 냉동고에 보관하였다. 한편, 혈액은 채혈 후 30분간 실온에서 방치하였다가 원심분리 ($3,000 \times g$, 10분)를 한 다음 상등액인 혈장을 사용하여 micro osmometer (μ Osmette™, Precision Systems, U.S.A.)로 삼투질 농도를 측정하였다. 신장은 Jeon et al. (2003)의 방법을 따라 마이크로솜과 세포질을 만들어 효소 분석에 사용하였다.

MFO 효소계의 분석과 통계처리

미크로솜의 CYP 농도는 Omura and Sato (1964), NADPH-cytochrome P450 환원효소의 활성은 Phillips and Langdon (1962), 7-ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)의 활성은 Burke and Mayer (1974)의 방법을 따라 분석하였으며, 세포질의 glutathione S-transferase (GST) 활성은 Habig et al. (1974)의 방법으로 측정하였다. 그리고 미크로솜과 세포질의 단백질 농도는 Lowry et al. (1951)의 방법으로 각각 정량하였다. 한편, 모든 측정치는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, SPSS (V. 10.0)를 사용하여 one-way ANOVA test를 실시하였고, Duncan's program으로 95% 신뢰구간에서 유의차 검정을 하였다.

결과 및 고찰

삼투질 농도의 변화

혈장 중 삼투질 농도의 변화는 Fig. 1과 같으며, sham구는 시간이 경과하여도 농도 변화가 없었지만 4-NP 주사구는 증가하여 168시간째에는 sham구와 유의적인 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 이것은 4-NP 주사에 의해 조피볼락의 삼투질 농도가 영향을 받았음을 보여준다.

어류에서는 시상하부-뇌하수체-부신 축이 아가미와 신장에 작용하여 정상적인 삼투압으로 조절하는데 중요한 역할을 하고, 오염물질로 인해 일어나는 대부분의 삼투압 조절의 교란은 부신 기능의 변화가 주요 원인이라고 알려져 있다 (Eddy, 1981). 물 속에서 오염물질을 흡수하면 간장이나 신장도

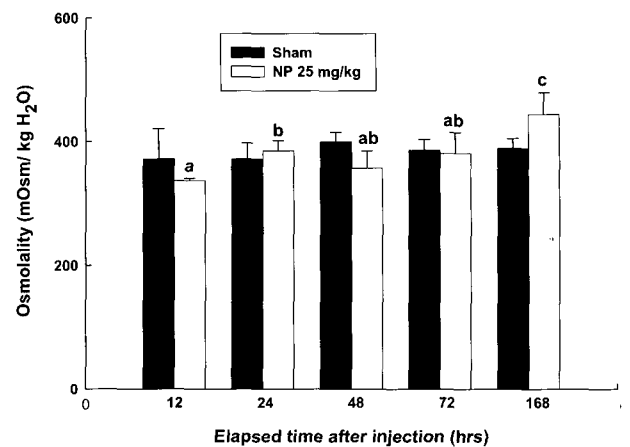


Fig. 1. Time course of changes in osmolality in rockfish (*S. schlegeli*), with exposure to 4-NP (25 mg/kg-bw). A same superscript in same exposure group are not significantly different ($p > 0.05$). Each value is the mean for nine animals \pm S.D.

영향을 받아 삼투압 조절이 교란된다는 것은 다른 연구에서도 관찰되고 있다 (Hilmy et al., 1983; Oulmi et al., 1995).

MFO 효소계의 변화

CYP 농도의 경시적인 변화는 Fig. 2와 같다. Sham구는 조사 기간 중 유의적인 변화를 보이지 않았으나, 4-NP 주사구는 24시간째에 가장 높았고 sham구의 1.8배나 되어 유의적인 차이를 보였다 ($p < 0.05$). 이후에는 48시간째에 sham구보다 낮았지만 ($p < 0.05$), 168시간째에는 회복되어 sham구와 비슷한 수준이 되었다. 이것은 4-NP 주사에 의해 신장에서 CYP 농도가 유도된다는 것을 보여주는 결과이다. 한편 Jeon et al. (2003)은 4-NP를 주사한 조피볼락의 간장에서 CYP 농도가 12시간째에 최고로 높았다고 하였는데, 본 실험에서 신장에서는 24시간째에 최고가 되어 시간적인 차이를 보였다. 이와 같은 간장과 신장에서의 CYP 농도의 유도에 시차가 있는 것은 아마도 오염물질을 대사하는 1차적인 기관이 간장이기 때문이라 생각된다 (Kime, 1998).

그리고 Figs. 3과 4는 각각 NADPH-cytochrome P450 환원효소 및 NADH-cytochrome b5 환원효소 활성의 변화이다. Sham구의 NADPH 의존성 환원효소 활성은 조사기간 중 유의적인 변화를 보이지 않았으나, 4-NP 주사구는 12시간째부터 sham구보다 낮았고 ($p < 0.05$), 168시간째에 비슷한 수준이 되었다 (Fig. 3). NADH 의존성 환원효소의 활성도 4-NP 주사구는 24시간부터 sham구보다 낮았고 ($p < 0.05$), 이후 168시간째에 비슷한 수준이 되었다. 이것은 4-NP 주사가 NAD(P)H 의존성 환원효소들의 활성을 억제한다는 것을 보여주는 것이다. 특히, NADPH cytochrome P450 환원효소는 CYP에게 전자를 전달하는 역할을 하는 효소인데 (Gibson and Skett, 2001), CYP 농도가 sham구에 비해 가장 낮았던 48시간과 72시간째에는 본 환원효소도 낮은 활성을 보였다. 하지만 24시간째에 4-NP

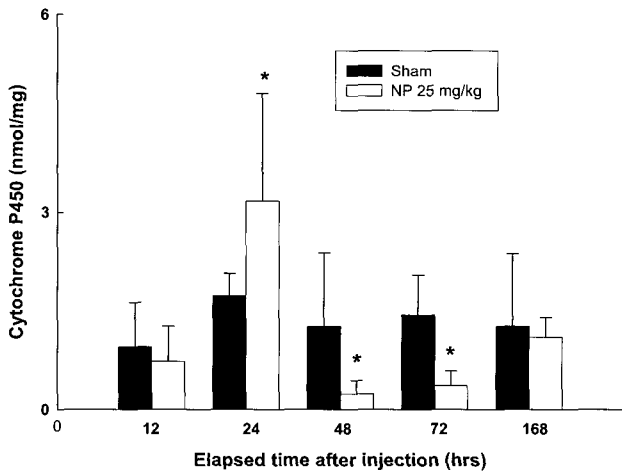


Fig. 2. Time course of changes in CYP level of the renal microsome in rockfish (*S. schlegeli*), with exposure to 4-NP (25 mg/kg-bw). *P<0.05 compared with the rockfish treated with DMSO (sham). Each value is the mean for nine animals ±S.D.

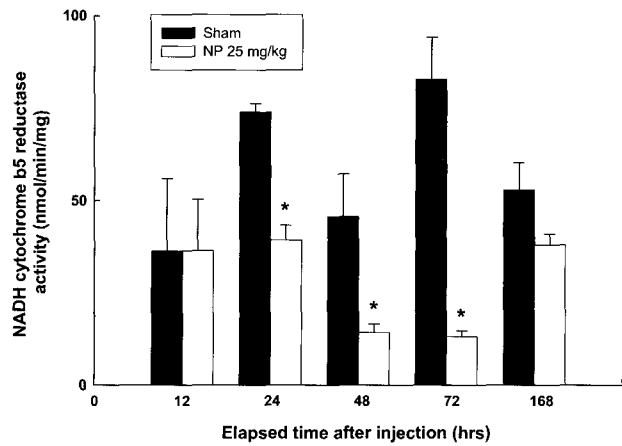


Fig. 4. Time course of changes in NADH-cytochrome b5 reductase activity of the renal microsome in rockfish (*S. schlegeli*), with exposure to 4-NP (25 mg/kg-bw). *P<0.05 compared with the rockfish treated with DMSO (sham). Each value is the mean for nine animals ±S.D.

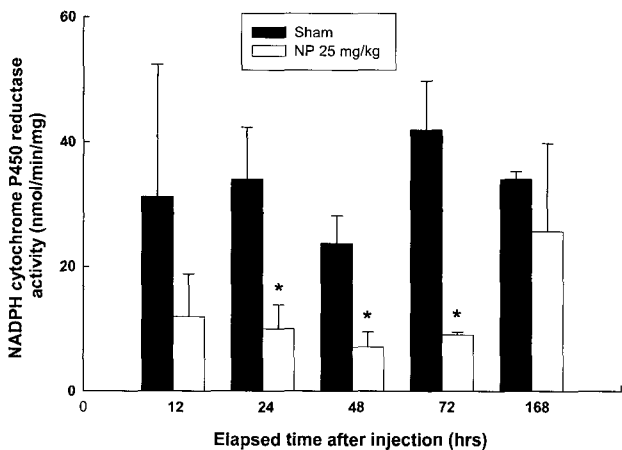


Fig. 3. Time course of changes in NADPH-cytochrome P450 reductase activity of the renal microsome in rockfish (*S. schlegeli*), with exposure to 4-NP (25 mg/kg-bw). *P<0.05 compared with the rockfish treated with DMSO (sham). Each value is the mean for nine animals ±S.D.

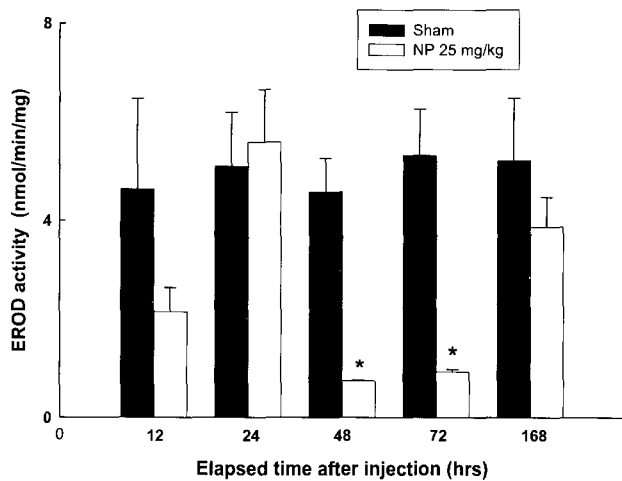


Fig. 5. Time course of changes in EROD activity of the renal microsome in rockfish (*S. schlegeli*), with exposure to 4-NP (25 mg/kg-bw). *P<0.05 compared with the rockfish treated with DMSO (sham). Each value is the mean for nine animals ±S.D.

주사구의 CYP 농도가 높았던 것은 CYP의 여러 subfamily의 효소들의 증가와 관련이 있을 것이라 여겨진다.

한편, EROD 활성의 경시적인 변화는 Fig. 5와 같다. EROD 활성은 CYP1A1의 지표 효소로 널리 이용되고 있는데, 본 실험에서 sham구의 EROD 활성은 168시간까지 유의적인 변화를 보이지 않은 것에 비해, 4-NP 주사구에서는 24시간째에 sham구보다 약간 높았고 이후 48시간과 72시간째에는 유의적으로 낮았다 (p<0.05). 이런 EROD 활성의 경시적인 변화 패턴은 CYP의 그것과 매우 유사하여 흥미로우며, 이것은 4-NP에 의해서 신장의 EROD 효소가 저해된다는 것을 보여준다. 이처

럼 4-NP가 어류의 EROD 활성을 저해한다는 것은 Arukwe et al. (1997)이 대서양연어 (*Salmo salar*)에서도 관찰한 바 있으며, *in vitro*로는 마우스의 hepatoma Hepa-1c1c7 세포 (Jeong et al., 2001)에서도 관찰된 바 있다.

Fig. 6은 세포질에서 GST 활성의 경시적인 변화를 나타낸 것이다. Sham구는 조사기간 중 효소활성이 크게 변하지 않았으나 4-NP 주사구는 24시간째에 정점을 이루면서 sham구보다 5.2배나 높아 유의적인 차이를 보였다 (p<0.05), 이후에는 감소하여 sham구와 비슷한 수준이 되었다. 이것은 4-NP 주사후 24시간째에 GST의 포합 반응이 가장 왕성하게 일어났음을

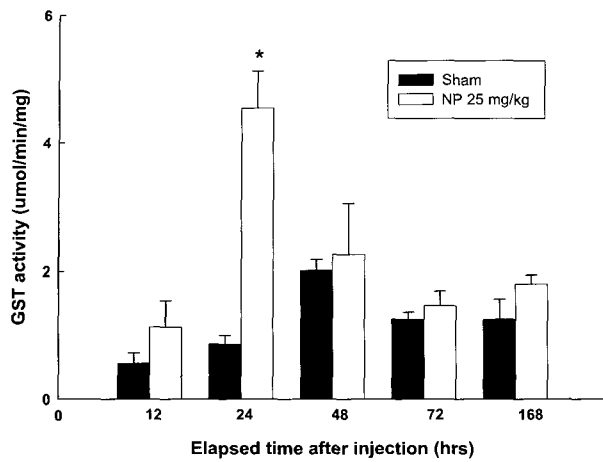


Fig. 6. Time course of changes in GST activity of the renal cytosol in rockfish (*S. schlegeli*), with exposure to 4-NP (25 mg/kg-bw). * $P < 0.05$ compared with the rockfish treated with DMSO (sham). Each value is the mean for nine animals \pm S.D.

보여준다.

이처럼 4-NP를 주사한 조피볼락의 신장에서는 CYP 농도를 비롯하여 EROD 및 GST 활성이 24시간 후에 가장 높았던 것으로 미루어, 이 시간에 약물대사가 가장 활발하게 이루어진다고 여겨진다. 그리고 4-NP 주사는 1회에 한정되었으므로 24시간 이후에는 점차 대사가 감소되는 것이라 생각된다.

이상으로 조피볼락의 신장 중 MFO 효소계는 4-NP에 의해 영향을 받아 반응한다는 것을 알 수 있었다. 하지만 반응 패턴은 효소단백질에 따라 달랐는데 즉, 포함효소인 GST의 활성은 조사기간 중 전반적으로 유도되었는데 반해 NAD(P)H 의존성 환원효소들은 억제되었고, EROD 활성과 CYP농도는 초기 24시간째에 일시적으로 증가하였다가 이후 다소 줄어드는 경향을 보였다.

이들 MFO 효소계는 체내에 들어온 오염물질을 해독하는데 이용되기도 하지만 본래 체내에 존재하면서 다른 화학물질을 합성하거나 불활성화 하는데 이용되기도 한다. 특히 CYP와 그 관련효소들은 스테로이드 호르몬의 불활성화에 관여하므로 만일 이들이 오염물질을 해독하는데 집중적으로 이용된다면 호르몬은 그만큼 덜 불활성화 될 것이고, 이 때문에 정상적인 스테로이드 호르몬의 합성이 지장을 받아 번식에 이상을 일으킬 수도 있다 (Kime, 1998). 이처럼 번식 내분비계에 영향을 미치는 화학물은 성호르몬에도 변화를 줄 것이므로 이것도 조사할 필요가 있을 것이다.

사 사

본 연구는 해양수산부 연구사업비의 지원을 받아 수행하였으며, 이에 감사 드립니다.

참 고 문 헌

Arukwe, A., L. Förlin and A. Goksøyr. 1997. Xenobiotic

and steroid transformation enzymes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) liver treated with an estrogenic compound, 4-nonylphenol. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16, 2576-2583.

Burke, M.D. and R.T. Mayer. 1974. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. *Drug Metab. Dispos.*, 2, 583-588.

Chester Jones I. and W. Mosley. 1980. The interrenal gland in pisces. Part 1. Structure. In: *General, Comparative and Clinical Endocrinology of the Adrenal Cortex*, Vol. 3, I. Chester Jones and I.W. Henderson, eds. Academic Press, London, pp. 395-472.

Eddy, F.B. 1981. Effects of stress on osmotic and ionic regulation in fish. In: *Stress and Fish*, Pickering A.D., ed. Academic Press, New York, pp. 77-102.

Gibson, G.G. and P. Skett. 2001. *Introduction to Drug Metabolism*. 3rd. ed. Chapman & Hall. London, pp. 293.

Habig, W.H., M.J. Pabst and W.B. Jakoby. 1974. Glutathione-S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, 249, 7130-7139.

Henderson, I.W. and D.E. Kime. 1987. The adrenal cortical steroids. In: *Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications*, Vol. 2, Regulation of Water and Electrocytes, P.K.T. Pang and M.P. Schreibman, eds. Academic Press, London, pp. 121-142.

Hilmy, A.M., H.K. Badawi and M.B. Shabana. 1983. Physiological mechanism of toxic action of DDT and endrin in two euryhaline freshwater fishes, *Anguilla vulgaris* and *Mugil cephalus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 76C, 163-171.

Jeon J.K., J.S. Lee, Y.C. Sohn, W.J. Shim, J.Y. Jeong, G.P. Hong, J.Y. Jeong and C.H. Han. 2003. Responses of cytochrome P450 and EROD activity in rockfish (*Sebastes schlegeli*) administered intraperitoneal injection of 4-nonylphenol. *Kor. J. Environ. Biol.*, (submitted) (in Korean)

Jeong, H.G., J.Y. Kim, C.Y. Choi, H.J. You and K.S. Hahm. 2001. Suppression of CYP1A1 expression by 4-nonylphenol in murine Hepa-1c1c7 cells. *Cancer Lett.*, 165, 95-101.

Kime, D.E. 1998. *Endocrine Disruption in Fish*. Kluwer Academic Publishers. Boston, pp. 396.

Lowry, O.H., N.J. Roseborough, L.A. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.

McLeese, D.W., V. Zitko, D.B. Sergeant, L. Burrigge and

- C.D. Metcalfe. 1981. Lethality and accumulation of alkylphenols in aquatic fauna. *Chemosphere*, 10, 723-730.
- Omura, T. and R. Sato. 1964. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239, 2370-2378.
- Oulmi, Y., R.D. Negele and T. Braunbeck. 1995. Cytopathology of liver and kidney in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after long-term exposure to sublethal concentrations of linuron. *Dis. Aquat. Org.*, 21, 35-52.
- Phillips, A.H. and R.G. Langdon. 1962. Hepatic triphosphopyridine nucleotide- cytochrome c reductase: isolation, characterization, and kinetic studies. *J. Biol. Chem.*, 237, 2652-2660.
- Tsuda, T., K. Suga, E. Kaneda and M. Ohsuga. 2002. 4-Nonylphenol, 4-nonylphenol mono- and diethoxylates, and other 4-alkylphenols in water and shellfish from rivers flowing into lake Biwa. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 68, 126-131.
- Yadette, F. and R. Male. 2002. Effects of 4-nonylphenol on gene expression of pituitary hormones in juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquat. Toxicol.*, 58, 113-129.

2003년 10월 10일 접수
2003년 12월 20일 수리